

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-117698

⑤ Int. Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 平成2年(1990)5月2日
C 07 K 15/12		8318-4H	
A 61 K 37/24	ABN		
	ADA	8615-4C	
	ADT		
	ZNA	A 7417-4C	
C 12 P 49/00		H 8214-4B	
// A 61 L 21/02		Q 6971-4C	
(C 12 P 27/00			
(C 12 P 21/02			
C 12 R 1:91)			

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全4頁)

⑭ 発明の名称 血管内皮細胞成長因子

⑮ 特 願 昭63-271389

⑯ 出 願 昭63(1988)10月27日

⑰ 発 明 者	佐 藤 威	宮城県仙台市荒巻字雷神堂山2-101
⑰ 発 明 者	山 根 績	宮城県仙台市八木山南6丁目6-20
⑰ 発 明 者	帯 刀 益 夫	東京都多摩市永山5-30-3-1
⑰ 出 願 人	東レ株式会社	東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
⑰ 出 願 人	味の素株式会社	東京都中央区京橋1丁目5番8号
⑰ 代 理 人	弁理士 川口 義雄	外2名

明 細 書

1. 発明の名称

血管内皮細胞成長因子

2. 特許請求の範囲

(1). ヒト二倍体線維芽細胞の無血清培養上清液を限外濾過法により濃縮し濃縮液をヘパリンセファロースアフィニティークロマトグラフィーついで逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製して得られる純化された血管内皮細胞成長因子。

(2). 血管内皮細胞に増殖促進活性を示しBalb/3T3細胞およびヒト二倍体線維芽細胞に対しては増殖促進活性を示さない請求項(1)記載の血管内皮細胞成長因子。

(3). Hep G2細胞表面FGFレセプターに対する<sup>125</sup>I-FGFの結合を阻害しない請求項(1)記載の血管内皮細胞成長因子。

(4). N末端側のアミノ酸配列が下記のものである請求項(1)記載の血管内皮細胞成長因子。

1                      5                      10  
Ser-Ser-Ser-Asp-Thr-X-Gly-Pro-X-Glu-

11                      15                      20  
Pro-Ala-Ser-X-Pro-Pro-Leu-Pro-Pro-Leu-

21                      25                      30  
Gly-X-Leu-Leu-Gly-Glu-X-X-Asp-Ala-

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、医薬あるいは診断薬として、さらには血管内皮研究上有用である純化された血管内皮細胞成長因子に関する。

[従来の技術]

近年、日本人の死亡率の上位を占める、脳卒中、心臓病の主原因は血管の老化、損傷、機能低下と考えられている。血管内皮細胞は血管の内腔を覆う単層を形成する細胞であり、血管の老化や損傷を引き起こす動脈硬化の原因である脂質代謝にも関与していることが推察されている。また、悪性腫瘍の増殖は血管新生と密接に関連しており、血管内皮細胞の増殖が必須条件である。さらには、やけどや創傷の治療にも血管新生が必要であり、血管内皮細胞成長因子の関与が明らかである。

以上のように、本来生体に存在していると思われる血管内皮細胞成長因子 (Endothelial cell growth factor, 以下ECGFと略す) を単離してその利用ができれば、動脈硬化に伴う血管内皮の保護薬および治療薬、またやけどや創傷などの治療促進薬となり得ることが期待できる。さらに、ECGFの拮抗薬は血管新生を阻害すると考えられることから、ECGFは、抗悪性腫瘍および慢性関節リウマチや網膜症の治療薬開発のための極めて有用な材料となり得ることが期待できる。加えて、動脈硬化や悪性腫瘍増殖などに起因して血管内皮の増殖が起こり、血中、尿、便などに通常の生理的濃度以上のECGFが存在しているとすれば(種々の疾病で特異的ホルモンの上昇はしばしば観察される)、ECGFに対する抗体を作成して、その抗体による前述の疾病の診断薬の開発が可能となる。このように、ECGFの医療上における存在価値は極めて大きく、ちなみに、悪性腫瘍、脳卒中、心臓病が、日本人の死亡率の上位3位までを占めていること(昭和61年度)か

ら考えても、ECGFの医療への利用、応用の有用性は明らかである。

上述のような背景と期待から、ECGFの探索は近年、精力的に行われてきており、たとえばヒトの脳、軟骨、肝ガン細胞などから分子量18,000~19,000、等電点約5あるいは約10のタンパク質[Lobbら, Anal. Biochem., 154, 1, (1986)]が見出されている。また最近、血小板由来のECGFも見出されており、分子量45,000、等電点4.6[Miyazonoら, J. Biol. Chem., 262, 4098, (1987)]と報告されている。[発明が解決しようとする問題点]

生体物質を抽出して利用する場合、その生産性や安全性が優れている材料や手法を用いることが重要である。ECGFの応用をこの点から考えれば、脳やガン細胞はやや問題があり、また血小板も大量入手は定常的には難しいと思われる。加えて、現在までにECGFは種々の分子種が見つかり、実際の医療への応用にはどの分子種が適しているのか、あるいは他の組織由来の未発見

のECGFの応用の可能性、などが今後の検討課題として残っている。

本発明は医薬への応用の可能性のあるECGFを、生産性や安全性が優れた方法で得ることにより、上述の問題点を解決しようとするものである。

本発明者らは、この目的に沿って鋭意研究の結果、本発明を完成した。

[問題点を解決するための手段]

本発明は、ヒト二倍体線維芽細胞の無血清培養上清液を限外濾過法により濃縮し濃縮液をヘパリンセファロースアフィニティークロマトグラフィーついで逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製して得られる純化されたECGFである。

本発明のECGFは、血管内皮細胞に増殖促進活性を示しBa1b/3T3細胞およびヒト二倍体線維芽細胞に対しては増殖促進活性を示さず、Hep G2細胞表面FGFレセプターに対する<sup>125</sup>I-FGFの結合を阻害しない。そしてそのN末端側に下記のアミノ酸配列を有する。

1	5	10
Ser-Ser-Ser-Asp-Thr-X-Gly-Pro-X-Glu-		
11	15	20
Pro-Ala-Ser-X-Pro-Pro-Leu-Pro-Pro-Leu-		
21	25	30
Gly-X-Leu-Leu-Gly-Glu-X-X-Asp-Ala-		

本発明のECGFはヒト二倍体線維芽細胞の培養上清液から得られる。ヒト二倍体線維芽細胞としてはECGF産生能を有するものであれば特に限定されないが、例えばヒト胎児肺由来の二倍体線維芽細胞を用いることができる。培養は先ず牛胎児血清を5~10%含む動物細胞用培地(例えば、イーグルMEM培地)で行う。およそ1~2×10<sup>5</sup>個/mlのヒト二倍体線維芽細胞を植込み、5%の炭酸ガス、36~38℃の条件下で2~3日培養する。ついでリン酸平衡生理食塩液(PBS)で2~3回洗浄した後、例えばRIC80-7のような無血清培地によって培地を交換し、5%の炭酸ガス、36~38℃の条件下で2~3日培養する。この培養液から得られるヒト

二倍体線維芽細胞の無血清培養上清液を限外濾過法により50~100倍に濃縮する。生じた沈澱を除去し、ヘパリンセファロースアフィニティークラムにかける。カラムを食塩水で洗浄し溶出蛋白質を集める。この溶出液に粉末硫酸を40%飽和になるように加え、生じた沈澱を集め、これをトリフルオロ酢酸(TFA)/アセトニトリル液に溶解して放置し、生じる沈澱を除去して上清を逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にかける。このようにして本発明の純化されたECGFを得ることができる。

本発明のECGFは、既知の血管内皮細胞成長因子である線維芽細胞成長因子(FGF)とは、細胞増殖促進活性およびFGFレセプターに対する結合能の点において次のように異なる。すなわち、FGFは血管内皮細胞、Balb/3T3細胞およびヒト二倍体線維芽細胞のいずれにも強い増殖促進活性を示すのに対して、ECGFは血管内皮細胞にのみ増殖促進作用を示すだけで、他の細胞に対しては作用しない。またHepG2細胞表面FG

Fレセプターに対する125I-FGFの結合をECGFは阻害しない。さらに本発明のECGFは、酸性および塩基性FGFやアンジオジェニン(Angiogenin)とアミノ酸の組成比を異にする。

本発明のECGFはN末端側に下記のアミノ酸配列を有する。

1	5	10
Ser-Ser-Ser-Asp-Thr-X-Gly-Pro-X-Glu-		
11	15	20
Pro-Ala-Ser-X-Pro-Pro-Leu-Pro-Pro-Leu-		
21	25	30
Gly-X-Leu-Leu-Gly-Glu-X-X-Asp-Ala-		

ここでXは不明であることを意味する。

本発明のECGFの活性判定は公知の活性測定法により行うことができる。すなわち、ニワトリ胎児のChorioallantoic membrane(CAM)を利用する方法[TaylorとFolkman, Nature, 297, 307(1982)およびFolkmanら, Science, 221, 719(1983)]、あるいは、ラット又はウサギのcorn eal micropocket法[Gimbroneら, J. Matl. C

ancer Inst., 52, 413(1974)およびFournierら, Invest. Ophthalmol. Visual Sci., 21, 351(1981)]、また、sustained-release polymer implantsを利用する方法[RangerとFolkman, Science, 263, 797(1976)およびMurrayら, In Vitro, 19, 743(1983)]などが挙げられる。簡便かつ迅速に行うには、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEEC)に対する増殖促進活性を、24ウェル・プラスチックディッシュに植え込んだHUVEECの増殖量を指標として測定する、KanとYananeの方法[J. Cell. Physiol., 111, 155(1982)]が望ましい。

本発明のECGFは、直接的には、創傷、火傷、術後組織などの治癒促進剤および心血管障害の治療剤として有用である。また、人工血管の内皮形成剤として用いることもできる。間接的には、この因子の共存により血管内皮細胞の長期培養が可能となり、血管内皮細胞研究に必須の試薬として用いることができる。また、本ECGFの抗体および阻害剤は、悪性腫瘍、網膜症、慢性関節リウ

マチの治療剤あるいは診断薬として有用である。

本発明のECGFは、タンパク質製剤としてそのまま粉末として、また薬理学的に許容されうる担体、賦形剤、希釈剤とともに医薬組成物(例、注射薬、錠剤、カプセル剤、液剤、軟膏)として、ヒトなどの温血動物に対して非経口的あるいは経口的に安全に投与することができる。

このように、本ECGFは、これまで有効な薬剤が少なかった当該分野に、新規で有用な薬剤として提供することができる。

#### [実施例]

##### A. ヒト二倍体線維芽細胞培養上清液の製造

ヒト二倍体線維芽細胞(10~40 PDL)を10%の牛胎児血清を添加したMEM培地に細胞数 $1 \times 10^5$ 個/mlで植込み、ローラーボトルを用い37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で2日間培養した。ついで培地を捨て、PBSで1回洗浄後RITC 80-7培地に交換し、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で2日間培養した。

##### B. ECGFの精製

上記により得られた培養上清液を、アミコン社製YM-10を用い限外濾過法により100倍に濃縮した。生じた沈澱を除去し、0.3M塩化ナトリウムを含む20mM酢酸緩衝液(pH4.0)で平衡化したヘパリンセファロースアフィニティークラムにかけた。塩化ナトリウム濃度を0.5Mに上げカラムを洗浄した後、さらに塩化ナトリウム濃度を1.5Mに上げ溶出タンパクカラムからの溶出液に粉末硫酸安全を40%飽和になるように加え、生じた沈澱を集め、0.1%TFAを含む10%アセトニトリル液5mlに溶解した。水中に2時間放置して生じた沈澱を除去し、上清をC-18セミアプレバラティブ逆相HPLCカラム(バイオラド社RP-318セミアプレバラティブカラム)にかけた。0.1%TFAの存在下で、25-40%アセトニトリル濃度勾配、60分、1ml/分の流量でECGF活性成分を溶出した。得られた活性分画をVydacのC-4逆相HPLCカラムにかけた。0.1%TFAの存在下で、25-35%アセトニトリル濃度勾配、30分、

1ml/分の流量で最も活性の高い分画を取り、C-4で再クロマトをして精製した。

### C. ECGFの分析

#### (1) アミノ酸配列分析

上記で得られた精製ECGFサンプルについて、気相式シーケンサー(Applied Biosystems 470A型)でEdman分解を行い、得られたPTH-アミノ酸をPTH-アミノ酸同定用HPLC(Applied Biosystems 120A型)で同定分析した。その結果、N末端のアミノ酸配列は下記のとおりであることがわかった。

1	5	10
Ser-Ser-Ser-Asp-Thr-X-Gly-Pro-X-Glu-		
11	15	20
Pro-Ala-Ser-X-Pro-Pro-Leu-Pro-Pro-Leu-		
21	25	30
Gly-X-Leu-Leu-Gly-Glu-X-X-Asp-Ala-		

6ヶ所のXは配列が決定できなかったものである。

#### (2) FGFとの比較

FGFは血管内皮細胞、Balb/3T3細胞およびヒ

ト二倍体線維芽細胞のいずれにも強い増殖促進活性を示すのに対して、ECGFは血管内皮細胞にのみ増殖促進作用を示すだけで、他の細胞に対しては作用しない。またHepG2細胞表面FGFレセプターに対する<sup>125</sup>I-FGFの結合をECGFは阻害しない。さらに本発明のECGFは、酸性および塩基性FGFやアンジオジェニン(Angiogenin)とアミノ酸の組成比を異にする。

#### 〔発明の効果〕

本発明のECGFは、火傷や創傷などの治癒促進剤および心血管障害の治療剤として有用である。また、悪性腫瘍、網膜症、慢性リウマチ等の治療薬および診断薬として、極めて有用な材料となり得る。さらに本発明のECGFは、従来のものに比べ生産性や安全性が非常に優れている方法で得ることができ、得られるECGFの純度も高い。

発明人(3/5) 東レ株式会社  
 代理人(006) 味・素株式会社  
 代理人 弁護士 川口 義雄  
 代理人 弁護士 中村 至  
 代理人 弁護士 船山 武